Lane Medical Library

DIE WERTBESTIMMUNG DES GENICKSTARRESERUMS.

INAUGURAL-DISSERTATION

ZUR ERLANGUNG

DER MEDIZINISCHEN DOKTORWÜRDE

AN DER

FRIEDRICH-WILHELMS-UNIVERSITÄT
ZU BERLIN

VON

GEORG BLUMENTHAL
AUS BIESENTHAL.

TAG DER PROMOTION: 22. MAI 1913.

LEIPZIG,
VEIT & COMP.
1913

Gedruckt mit Genehmigung der medizinischen Fakultät der Universität Berlin.
Referent: Prof. Dr. Flügge.

Sonderabdruck aus der
„Zeitschrift für Hygiene und Infektionskrankheiten“. Bd. LXXIV. 1913.

Druck von Metzger & Wittig in Leipzig.

MEINEN ELTERN

IN LIEBE UND DANKBARKEIT.

I. Historisches.

Wie einst bei dem Diphtherieserum, so haben sich auch bei dem Meningokokkenserum große Schwierigkeiten ergeben, diesem allgemein die Anerkennung zu verschaffen, die ihm eigentlich gebührt und jetzt wohl auch von der Mehrzahl der Autoren gezollt wird. Über ganz unbefriedigende Resultate haben nur Matthes und Hochhaus in Cöln, sowie v. Wyss in Zürich berichtet, doch fallen diese Arbeiten noch in eine Zeit, wo man zu wenig Erfahrung in der Anwendungsweise des Serums besaß und erst im letzten und dann auch ungünstigsten Moment zur intralumbalen Applikation schritt, wenn jede Hilfe zu spät kam. Dasselbe gilt auch von den Veröffentlichungen von E. Watt und von Curie und Mc. Gregor in Glasgow, die ebensowenig die Überzeugung über eine günstige Wirkung des Serums zu gewinnen vermochten.

Demgegenüber stehen Beobachtungen einer stattlichen Anzahl von Autoren aus den verschiedensten Orten der Welt, die in voller Übereinstimmung glänzende Resultate gesehen haben und die Mortalität bei der Genickstarre, die in den großen Epidemien der Jahre 1904 bis 1908 durchschnittlich über 60 Prozent betrug, bei rechtzeitiger und intralumbaler Anwendung des Serums auf die Hälfte und bei Abzug der foudroyanten

Fälle sogar auf ein Viertel herabdrücken konnten. Aus der Fülle der Berichte seien beispielsweise folgende angeführt:

Flexner behandelte 712 Fälle mit 31·4 Prozent Mortalität,
Netter „ 100 „ „ 28 „ „
bei Abzug der foudroyanten Fälle mit 10·9 Prozent Mortalität,

Dopter behandelte 402 Fälle mit 16·44 Prozent bzw. 12·27 Prozent Mortalität,

endlich Levy in Essen 165 Fälle mit 18·18 Prozent bzw. 10·06 Prozent Mortalität.

Aus diesen Berichten, denen noch eine große Reihe von ebenso günstigen Beobachtungen an kleinerem Krankenmaterial anzufügen wäre, geht wohl deutlich hervor, daß das Meningitisserum einen unentbehrlichen Faktor in der Bekämpfung dieser so gefährlichen und noch immer weit verbreiteten Seuche bedeutet.

II. Herstellung des Serums.

Schon Bonhoff hatte Kaninchen durch intravenöse Impfung mit langsam steigenden Dosen einer 48 Stunden alten Meningokokken-Blutserumkultur künstlich immunisiert und Spuren von Schutzstoffen im Blut dieser Tiere dadurch nachgewiesen, daß er weißen Mäusen gleichzeitig mit der minimalen Letaldosis von einer 48stündigen Meningokokken-Blutserumkultur 0·25 ccm seines Kaninchenmeningokokkenserums intraperitoneal gab und dadurch seine Tiere am Leben erhielt, während andere Kontrolltiere, mit der gleichen Dosis ohne Meningokokkenserum behandelt, bereits nach 24 Stunden zugrunde gingen.

Ferner hatten bereits Jäger und später v. Lingelsheim und Leuchs durch Behandlung von Kaninchen mit lebenden Meningokokken zu diagnostischen Zwecken sich Seren hergestellt, welche für echte Meningokokken Agglutinationstiter bis zu 1 : 2000 aufwiesen, aber einen eigentlichen Heilwert nicht besaßen.

Erst Kolle und Wassermann und gleichzeitig unabhängig von ihnen Jochmann wählten größere Tiere, speziell Pferde zur Darstellung größerer Mengen eines Meningokokkenheilserums.

Im Hinblick auf seine früheren Versuche mit dem Bacillus pyocyaneus, die das wichtige Ergebnis zeitigten, daß Tiere, mit den wasserlöslichen toxischen Leibessubstanzen der Bazillen vorbehandelt, ein Serum von verhältnismäßig hoher antitoxischer Kraft lieferten, ging v. Wassermann später bei der Immunisierung seiner Pferde in folgender Weise vor:

Er spritzte zunächst eine Gruppe von Pferden mit mehreren biologisch und serologisch möglichst verschiedenen Meningokokkenstämmen in steigenden Dosen zuerst subkutan, dann intravenös, ferner eine weitere Gruppe von Pferden in derselben Weise mit einem Stamm, der erfahrungsgemäß die hochwertigsten Sera lieferte. Vor allem aber wurde eine Anzahl Pferde mit den wasserlöslichen Stoffen der Meningokokkenleiber vorbehandelt und damit möglichst hoch immunisiert. Die Mischung dieser drei so verschieden gewonnenen Sera ergab dann ein „multipartiales Serum" von hohem agglutinatorischen Titer und von auffallendem Heilwerte.

Mit geringen Abweichungen bedienen sich auch Kolle in Bern, Paltauf in Wien, Dopter in Paris dieses Verfahrens zur Herstellung wirksamer Meningokokkensera, ebenso Jochmann für die Chemische Fabrik Merck in Darmstadt, der zugleich großen Wert auf möglichst frisch aus Lumbalflüssigkeit gezüchtete Stämme legt, die Immunisierung mit wässerigen Extrakten jedoch nicht anwendet, ferner Flexner in New York, der aber statt mit wässerigen mit autolysierten Meningokokkenextrakten arbeitet.

Nur Ruppel stellt sein Serum, das von den Höchster Farbwerken abgegeben wird, etwas abweichend davon in der Weise dar, daß er durch konsequentes Fortzüchten einer Reihe von Meningokokkenstämmen auf einem flüssigen Nährboden von konstanter Zusammensetzung die Virulenz derselben für Tiere möglichst steigert und diese künstlich hochvirulent gemachten Stämme Pferden intravenös injiziert.

III. Wertbestimmung des Serums.

Auf Veranlassung von Herrn Geheimrat v. Wassermann unterzog ich sämtliche oben angeführte Sera, die mir bereitwilligst von den Herstellungsorten überlassen wurden, der Prüfung auf ihren Antikörpergehalt und suchte gleichzeitig bei diesen Versuchen den Nachweis zu führen, welcher von den vielen angegebenen Wertbestimmungmethoden der Vorzug zu geben sei.

Selbstverständlich müssen sämtliche hier mitgeteilten Protokolle nur als Beispiele für eine Serumprüfung angesehen werden und gestatten nicht ohne weiteres den Schluß, als ob hier gleichzeitig ein Urteil über die Wirksamkeit der von den einzelnen Instituten gelieferten Sera abgegeben würde. Ein solches Urteil wäre an sich schon deshalb unmöglich, weil von jeder Stelle nur höchstens je zwei Proben von verschiedener Operationsnummer zu den Versuchen herangezogen wurden.

Bei Berücksichtigung des Herstellungsmodus der Sera kann man ihre Wirkungsweise in eine antitoxische und eine antiinfektiöse Komponente zerlegen. Demgemäß muß bei ihrer Prüfung zunächst auf die antitoxische Kraft Wert gelegt werden.

A. Nachweis von Antitoxinen bzw. Antiendotoxinen.

Schon v. Wassermann suchte, da seine Pferde mit den durch Ausschütteln mit destilliertem Wasser gewonnenen, also an die lebende Zelle gebundenen Extraktivstoffen der Meningokokkenleiber vorbehandelt wurden, im Tierversuch die giftneutralisierende Kraft seines Serums auszuwerten. Und zwar wurde stets je 0·1 ccm Toxin, eine Dosis, die nachweislich Meerschweinchen von 150 g innerhalb von 24 Stunden tötete, gemischt mit steigenden Mengen antitoxischen Serums Meerschweinchen in die Bauchhöhle injiziert. Wenn sich auch bei diesen Versuchen eine gewisse Schutzwirkung des Serums deutlich erkennen ließ in der Weise, daß schon 0·3 ccm Immunserum imstande waren, 0·1 ccm Toxin zu neutralisieren und die Tiere dadurch am Leben zu erhalten, während die Kontrolltiere sämtlich nach 24 Stunden starben, so ging doch gleichzeitig aus ihnen hervor, daß die innerhalb kurzer Zeiträume auftretenden plötzlichen Virulenzschwankungen der Meningokokkenstämme und die sehr variable individuelle Widerstandsfähigkeit der einzelnen Tiere gegen die Meningokokkeninfektion eine zuverlässige, gleichbleibende Prüfungsmethode auf diesem Wege zur Unmöglichkeit machten.

Auch die Bemühungen mit Hilfe der künstlichen, nach der Bailschen Methode hergestellten „Aggressine“ eine für Meerschweinchen untertödliche Dosis tödlich zu gestalten und so eine konstante Wertbemessungsmethode im Tierversuche zu erzielen, schlugen ebenfalls fehl, so daß eine Serumprüfung durch den Tierversuch jetzt im Laboratorium v. Wassermanns ganz verlassen worden ist.

Zu ähnlichen negativen Resultaten gelangte auch R. Kraus, der in Gemeinschaft mit Dörr und Bächer aus auf Agar gewachsenen Meningokokken mit $^1/_{10}$ Normalsodalösung die Toxine extrahierte und mit diesen die Prüfung des Serums auf seinen Gehalt an Antitoxinen bzw. Antiendotoxinen an jungen Meerschweinchen vornahm.

Kraus sowohl, wie auch später Heller, Krumbein und Diehl sowie Flexner und Jobling erhielten zwar Extrakte, die nach intraperitonealer Injektion von 0·5 bis 3.0 ccm Meerschweinchen von 125 g Körpergewicht innerhalb von 24 Stunden töteten, doch stießen sie infolge der schwankenden Virulenz der Kulturen und der verschiedenen Empfänglichkeit der einzelnen Tiere gegenüber der Intoxikation ebenfalls auf zu

große Schwierigkeiten, die sich auch dadurch nicht umgehen ließen, daß sie zunächst in vitro Toxin und Antitoxin mischten und dies Gemisch den Versuchstieren injizierten.

Nur Ruppel will zu einwandsfreien Ergebnissen bei der Auswertung im Tierversuch gelangt sein. Durch konsequentes Fortzüchten einer Reihe von Meningokokkenstämmen auf flüssigen Nährböden von konstanter Zusammensetzung steigert er die Virulenz derselben derart, daß z. B. eine Dosis von 1 ccm einer Verdünnung von 1 : 1000000 genügte, um eine Maus in 1 bis 2 Tagen und junge Meerscheinchen bei subkutaner Injektion in 6 bis 8 Tagen unter dem Bilde der Septicaemie zu töten, und wertet gegen diese allerdings völlig veränderten Passagestämme das Serum im Tierversuch aus. Jedoch haben diese Beobachtungen noch von keiner Seite bestätigt werden können.

B. Nachweis von Agglutininen.

Die Agglutination ist ebenfalls für die Wertbestimmung des Meningokokkenserums nicht anwendbar, zumal sie auch offenbar zu seiner Heilwirkung in gar keiner Beziehung steht. Wie auch aus meinen Versuchen hervorgeht, ist der Einfluß ein und desselben Serums gegenüber verschiedenen Stämmen echter Meningokokken ein recht variabler. Ferner werden wiederum Stämme, die das eine Serum stark agglutiniert, von einem anderen Serum sehr schwach agglutiniert und umgekehrt.

In Protokoll I ist ein solcher Agglutinationsversuch dargestellt, der mit sieben Seris verschiedener Herkunft und drei voneinander auch schon im Wachstum unterscheidbaren Meningokokkenstämmen ausgeführt wurde und deutlich die großen Schwankungen in der Agglutinierbarkeit der einzelnen Stämme durch die einzelnen Sera zur Anschauung bringt.

C. Nachweis von komplementbindenden Ambozeptoren.

Eine wesentliche Bereicherung erfuhr die Wertbemessung des Meningitisserums durch den Vorschlag v. Wassermanns und Brucks, in vitro nach der Bordet-Gengouschen Komplementbindungsmethode den Gehalt an komplementbindenden Stoffen nachzuweisen. Wenn auch nach Ansicht von Haendel, sowie von Krumbein uud Schatiloff diesen sogenannten Bordetschen Antikörpern keine große Bedeutung in bezug auf ihre Heilkraft beigemessen wird, wobei ihnen jedoch die genannten Autoren nicht jeden Heilwert direkt absprechen wollen, und wenn ferner die Versuche von Jochmann, Moreschi, Neufeld und Hüne den Nachweis erbrachten, daß diese hier nachzuweisenden komplementbindenden

Protokoll I.

Agglutination nach 24 Stunden bei 37°.

Serum	Stamm	1:10	1:20	1:40	1:80	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1000
Berlin	Beuthen	$+_4$	$+_4$	$+_4$	$+_3$	$+_3$	$+_2$	$+_2$	$+_2$	$+_1$
	3	$+_4$	$+_4$	$+_3$	$+_3$	$+_2$	$+_2$	$+_1$	$+_1$	—
	5	$+_3$	$+_3$	$+_3$	$+_2$	$+_2$	$+_1$	$+_1$	$+_1$	—
Bern	Beuthen	$+_4$	$+_4$	$+_3$	$+_3$	$+_2$	$+_2$	$+_2$	$+_1$	—
	3	$+_3$	$+_3$	$+_3$	$+_2$	$+_2$	$+_2$	$+_1$	$+_1$	—
	5	$+_3$	$+_3$	$+_3$	$+_3$	$+_2$	$+_2$	$+_2$	$+_1$	$+_1$
Wien	Beuthen	$+_4$	$+_4$	$+_4$	$+_3$	$+_3$	$+_3$	$+_2$	$+_2$	$+_1$
	3	$+_4$	$+_4$	$+_3$	$+_3$	$+_2$	$+_2$	$+_1$	—	—
	5	$+_3$	$+_3$	$+_2$	$+_2$	$+_1$	$+_1$	$+_1$	—	—
New York	Beuthen	$+_3$	$+_3$	$+_2$	$+_2$	$+_2$	$+_1$	$+_1$	—	—
	3	$+_4$	$+_4$	$+_4$	$+_3$	$+_3$	$+_3$	$+_2$	$+_2$	$+_1$
	5	$+_3$	$+_3$	$+_2$	$+_2$	$+_1$	$+_1$	—	—	—
Paris	Beuthen	$+_4$	$+_4$	$+_3$	$+_3$	$+_3$	$+_2$	$+_2$	$+_1$	—
	3	$+_4$	$+_4$	$+_3$	$+_3$	$+_2$	$+_2$	$+_1$	$+_1$	—
	5	$+_3$	$+_3$	$+_2$	$+_2$	$+_2$	$+_1$	$+_1$	—	—
Darmstadt	Beuthen	$+_3$	$+_3$	$+_2$	$+_2$	$+_1$	$+_1$	—	—	—
	3	$+_4$	$+_4$	$+_4$	$+_3$	$+_3$	$+_2$	$+_2$	$+_1$	$+_1$
	5	$+_3$	$+_3$	$+_3$	$+_2$	$+_2$	$+_1$	$+_1$	—	—
Höchst	Beuthen	$+_4$	$+_4$	$+_4$	$+_3$	$+_3$	$+_2$	$+_2$	$+_1$	—
	3	$+_3$	$+_3$	$+_2$	$+_2$	$+_1$	$+_1$	—	—	—
	5	$+_3$	$+_3$	$+_2$	$+_1$	—	—	—	—	—

NaCl-Kontrolle —. Typhusserum-Kontrolle —.

$+_4$ = sehr stark, $+_3$ = ziemlich stark, $+_2$ = deutlich, $+_1$ = gering.

Ambozeptoren als nicht bakterizide Antikörper aufzufassen sind, so ist dennoch die Komplementbindungsmethode bei der Auswertung des Genickstarreserums uns unentbehrlich geworden, zumal die oben erwähnten Autoren auch keinen einwandsfreien Weg für den Nachweis der echten bakteriziden Ambozeptoren gezeigt haben.

Bei der Nachprüfung dieser Methode hielt ich mich streng an die Vorschriften v. Wassermanns, der als Antigen anstatt der Vollbakterien Extrakte aus denselben verwendet wissen will, und zwar benutzte ich zu meinen Versuchen sowohl Extrakte aus einzelnen echten Meningokokkenstämmen, wie Stamm Beuthen, Gelsenkirchen, Stamm 3, als auch multipartiale Extrakte, die aus 5 (Extrakt A) bzw. 7 (Extrakt B) verschiedenen Meningokokkenkulturen hergestellt waren.

Zu diesem Zwecke wurden Kollesche Chapoteauagarschalen mit den einzelnen Stämmen beschickt, 24 Stunden bebrütet und mit je 5 ccm destilliertem Wasser abgespült. Die so erhaltene Bakterienaufschwemmung wurde im Schüttelapparat 48 Stunden geschüttelt, mit 5prozentiger Karbollösung bis zum Gesamtgehalt von 0·5 Prozent Karbol versetzt und dann

klar abzentrifugiert. Bei der Prüfung dieser Extrakte, die stets unter Lichtabschluß im Eisschrank aufgehoben wurden, konnte ich die Beobachtungen v. Wassermanns bestätigen, daß zunächst ihr Titer in den ersten Wochen schwankt, nach einiger Zeit aber, richtig eingestellt, auf mindestens 1 bis 2 Jahre seinen konstanten Wert behält.

Protokoll II zeigt die Prüfung des Antigens A am 21. XII. 1911 gleichzeitig auf Eigenhemmung und Spezifizität.

Protokoll II.
Titrierung von Extrakt A.

Extrakt A	Sicheres Meningitis-serum	Typhus-serum	NaCl
0·3	H	H	H
0·2	H	st. L	st. L
0·15	H	L	f. c. L
0·12	H	L	L
0·1	H	L	L
0·09	H	L	L
0·08	H	L	L
0·06	H	L	L
0·05	H	L	L
0·04	beg. L	L	L
Standard Extrakt Dosis: 0·05	H	L	L

Protokoll III.
Titrierung von Extrakt B.

Extrakt B	Sicheres Meningitis-serum	Typhus-serum	NaCl
0·3	H	H	H
0·2	H	st. L	st. L
0·15	H	L	L
0·12	H	L	L
0·1	H	L	L
0·09	H	L	L
0·08	H	L	L
0·06	H	L	L
0·05	beg. L	L	L
0·04	st. L	L	L
Standard Extrakt Dosis: 0·05	H	L	L

H = Hemmung der Hämolyse, beg. L = beginnende Lösung, st. L = starke Lösung, f. c. L = fast komplette Lösung, L = komplette Lösung.

Wie bei allen anderen Versuchen diente auch hier als Komplement eine 10prozentige Lösung frischen Meerschweinchenserums, als Erythrozyten eine 5prozentige Aufschwemmung sorgfältig gewaschener Hammelblutkörperchen und als hämolytischer Ambozeptor das Serum eines mit Hammelblutkörperchen vorbehandelten Kaninchens, dessen Titer jedesmal durch einen selbständigen Vorversuch festgestellt und je nach der jeweiligen Stärke des Komplements zwischen 1 : 1200 und 1 : 1600 gefunden wurde. Als Gebrauchsdosis wurde dann das Vierfache, also 1 : 300 bis 1 : 400 genommen.

Wie aus Protokoll II hervorgeht, beginnt sich erst in der Dosis 0·15 eine geringe Eigenhemmung bemerkbar zu machen, während bei 0·12 komplette Hämolyse eingetreten ist. Da die Hälfte dieser Dosis noch mit dem durch den gleichzeitig eingestellten Standardextrakt als spezifisch gekennzeichneten Meningokokkenserum vollständige Hemmung ergibt, so

ist der Titer dieses Extraktes A: 0·06. Extrakt B besitzt, nach der gleichen Versuchsanordnung geprüft, wie aus Protokoll III ersichtlich, den Titer 0·08, und beide Extrakte haben auch heute noch ihre Gebrauchsdosis unverändert behalten.

Mit diesen beiden genau ausgewerteten Antigenen prüfte ich je zwei Proben von Meningokokkenseren aus sieben verschiedenen Herstellungsstätten und erhielt, abgesehen von geringen Abweichungen, mit beiden Extrakten die gleichen Resultate in bezug auf ihren Gehalt an komplementbindenden Antikörpern.

Aus der Reihe meiner Versuche mögen Protokoll IV und V herausgegriffen sein.

Protokoll IV.

Komplementbindung mit Extrakt A. Dosis: 0·06 am 4. I. 1912.

Verdünnung	Serum Berlin	Serum Bern	Serum Wien	Serum New York	Serum Paris	Serum Darmstadt	Serum Höchst	Normalserum
0·2	H	H	H	H	H	H	beg. L	L
0·1	H	H	H	H	H	H	beg. L	L
0·05	H	H	H	H	H	H	st. L	L
0·01	H	H	H	H	H	f. c. H	st. L	L
0·005	H	H	beg. L	beg. L	beg. L	st. L	L	L
0·001	st. L	st. L	f. c. L	f. c. L	f. c. L	L	L	L
NaCl-Serum-Kontrolle	L	L	L	L	L	L	L	L

Doppelte Extrakt-Kontrolle: L.

Protokoll V.

Komplementbindung mit Extrakt B. Dosis: 0·08.

Verdünnung	Serum Berlin	Serum Bern	Serum Wien	Serum New York	Serum Paris	Serum Darmstadt	Serum Höchst	Normal-Serum
0·2	H	H	H	H	H	H	beg. L	L
0·1	H	H	H	H	H	H	st. L	L
0·05	H	H	H	H	H	H	st. L	L
0·01	H	H	f. c. H	f. c. H	f. c. H	f. c. H	f. c. L	L
0·005	f. c. H	f. c. H	st. L	st. L	st. L	st. L	L	L
0·001	st. L	f. c. L	L	L	L	L	L	L
NaCl-Serum-Kontrolle	L	L	L	L	L	L	L	L

Doppelte Extrakt-Kontrolle: L.

In beiden liegt der Titer des Berliner Institutsserums bei 0·005, des Berner Serums ebenfalls bei 0.005, der Wiener, Pariser und New Yorker Sera zwischen 0·005 und 0·01, und zwar näher an 0·01, des Merck-

schen Serums bei 0·01, während das Höchster Serum auch in der verhältnismäßig hohen Dosis von 0·2 kein Komplement zu fixieren vermag.

Wenn nun Kraus und Bächer bei Verwendung von Extrakten, die aus je einem Meningokokkenstamm hergestellt waren, so starke Unregelmäßigkeiten im Ausfall der Resultate beobachtet haben, daß sie die Komplementbindungsmethode bei der Auswertung des Meningitisserums ganz verwerfen, so stehen damit meine Versuche insofern in Widerspruch, als nach Protokoll VI ein aus Stamm Beuthen sowohl wie aus Stamm Gelsenkirchen gewonnener Extrakt für die oben erwähnten sieben Sera zwar nur annähernd richtige, aber immerhin noch brauchbare Titergrenzen ergeben.

Protokoll VI.

Komplementbindung mit Stamm Beuthen und Gelsenkirchen.

Verdünnung	Extrakt	Serum Berlin	Serum Bern	Serum Wien	Serum New York	Serum Paris	Serum Darmstadt	Serum Höchst	Normal-Serum
0·1	Beuthen	H	H	H	H	H	H	st. L	L
	Gelsenkirchen	H	H	H	H	H	H	st. L	L
0·05	Beuthen	H	H	H	H	H	H	f. c. L	L
	Gelsenkirchen	H	H	f. c. H	H	H	f. c. H	f. c. L	L
0·01	Beuthen	H	f. c. H	f. c. H	f. c. H	f. c. H	beg. L	L	L
	Gelsenkirchen	f. c. H	H	f. c. H	beg. L	f. c. H	beg. L	L	L
0·005	Beuthen	f. c. H	f. c. H	st. L	st. L	st. L	st. L	L	L
	Gelsenkirchen	f c. H	beg. L	st. L	st. L	st. L	st. L	L	L
0·001	Beuthen	st. L	st. L	L	L	L	L	L	L
	Gelsenkirchen	st. L	st. L	L	L	L	L	L	L
NaCl-Serum-Kontr.	L	L	L	L	L	L	L	L	L

Doppelte Extrakt-Kontrolle: { Beuthen: L. Gelsenkirchen: L.

Ganz umgehen lassen sich übrigens diese Ungenauigkeiten, wenn man nach der Forderung v. Wassermanns stets multipartiale, aus mindestens fünf verschiedenen Kulturen bereitete Antigene verwendet und dieselben nach mehrmonatlicher Lagerung sorgfältig ausdosiert. Sie werden auf Jahre hinaus ihren Titer beibehalten und stets vollkommen quantitativ verlaufende Resultate ergeben, Resultate, die nach den beigegebenen Protokollen jede falsche subjektive Deutung von vornherein insofern auch ausschließen, als stets markante Unterschiede zwischen kompletter Hemmung und beginnender bzw. starker Lösung bestehen.

Auch die Sera verlieren ihren Ambozeptorengehalt selbst nach einem Jahre und darüber nicht, wenn sie gut verkorkt und unter Lichtabschluß

im Eisschrank aufgehoben werden. Der im Protokoll IV mit dem Extrakt A am 4. Januar 1912 ausgeführte Versuch wurde am 6. Januar 1913 genau wiederholt. (Protokoll VII.) Ein Vergleich beider Protokolle läßt nur ganz geringfügige und unbedeutende Unterschiede erkennen, die wohl nur auf die Schwankungen des Komplements zurückzuführen sind, das am 6. Januar 1913 etwas schwächer war als am 4. Januar 1912, so daß hieraus wiederum eine etwas stärkere, sich aber bei allen Seris in gleichmäßiger Weise zeigende Hemmungstendenz resultierte.

Protokoll VII.

Komplementbindung mit Extrakt A. Dosis: 0·06 am 6. I. 1913.

Verdünnung	Serum Berlin	Serum Bern	Serum Wien	Serum New York	Serum Paris	Serum Darmstadt	Serum Höchst	Normal-Serum
0·2	H	H	H	H	H	H	beg. L	L
0·1	H	H	H	H	H	H	beg. L	L
0·05	H	H	H	H	H	H	beg. L	L
0·01	H	H	H	H	H	H	st. L	L
0·005	H	H	f. c. H	f. c. H	f. c. H	beg. L	st. L	L
0·001	beg. L	beg. L	beg. L	st. L	st. L	st. L	L	L
NaCl-Serum-Kontrolle	L	L	L	L	L	L	L	L

Doppelte Extrakt-Kontrolle: L.

D. Nachweis von Bakteriotropinen.

Hand in Hand mit dem Gehalt an Bordetschen Antikörpern im Meningokokkenserum geht ein verhältnismäßig hoher Gehalt an phagozytosebefördernden Stoffen. Schon Jochmann machte darauf aufmerksam, gab aber für den Nachweis dieser Stoffe keine bestimmte Methode an, und auch Kolle und v. Wassermann haben bereits in ihrer ersten Veröffentlichung auf das Vorhandensein derartiger Körper hingewiesen. Ferner konnten Flexner und Jobling in Amerika und in Deutschland Levy in Essen bei der mikroskopischen Untersuchung der Lumbalflüssigkeit von Genickstarrekranken eine auffallend verstärkte Phagozytierung der Kokken nach Injektion spezifischen Serums beobachten. Aber erst Neufeld zeigte einen praktisch brauchbaren und jetzt wohl allgemein anerkannten Weg, der die quantitative Wertbemessung des Meningitisserums nach seinem Tropingehalt in einwandsfreier Weise in vitro gestattete.

Auch diese Methode prüfte ich an den schon erwähnten sieben Seris und führte meine ersten Versuche genau nach der Originaltechnik aus, wobei ich allerdings, wie auch später oft, auf große Schwierigkeiten bei der Auswahl des geeigneten Meningokokkenstammes stieß, ein Umstand, auf den Neufeld ebenfalls in seinen Veröffentlichungen hinweist. Nicht

jede echte Meningokokkenkultur eignet sich gleich gut für die Phagozytoseversuche, besonders deshalb, weil die Kokken teils zu schnell von den Leukozyten aufgenommen und verdaut werden, teils aber bereits während der Dauer der Reaktion spontaner Degeneration anheimfallen und dann zu Klumpen geballt Anlaß zu falschen Resultaten geben.

Trugschlüsse aus der zu starken Spontanphagozytose lassen sich allerdings leicht durch Vergleich mit der zuerst und zuletzt angelegten Kochsalzkontrolle ausschalten, dagegen ist bei zu starker Degeneration am besten ein anderer Stamm auszuwählen. Jedoch ist manches Mal der Grund in einem ungeeigneten Nährboden zu suchen, und es ist mir bisweilen gelungen, durch Umzüchtung des betreffenden Stammes auf gewöhnlichen schwach alkalischen Agar noch brauchbare Resultate zu erhalten. Besonders bemerkenswert war in dieser Hinsicht der Stamm 6, der sich, auf Löffler-Serum gezüchtet, vornehmlich in Semmel- und Tetragenusformen präsentierte und starke Spontanphagozytose zeigte, als er sich an gewöhnlichen schwach alkalischen Agar dagegen angepaßt hatte, noch ganz leidlich gute Bilder lieferte.

Als das sicherste und beste Verfahren hat sich mir das folgende erwiesen:

Ich züchtete frisch aus Lumbalflüssigkeit isolierte Kulturen, die ja bei der allgemeinen Verbreitung der Meningitis noch reichlich zur Verfügung stehen, auf Aszitesagar und auf Löffler-Serum, überimpfte jeden Tag weiter und übertrug dieselben nach Verlauf von etwa 8 Tagen auf gewöhnlichen schwach alkalischen Agar. Es fanden sich stets einzelne Stämme, die üppig in grauem, undurchsichtigem Belag auf diesem Nährboden angingen und dann gefärbt einwandsfreie klare Bilder ohne Körnelung und Klumpenbildung ergaben.

Ganz unerklärlich ist mir die Tatsache geblieben, daß sich Bouillonkulturen nicht für die Phagozytose eignen. Auch bei weitgehendster Änderung der Versuchsanordnung ließen sich mit keiner Meningokokkenbouillonkultur Bakteriotropine in allen mir zur Verfügung stehenden 14 Seris zur Anschauung bringen. Vielleicht sind Analogien damit in Bordets schon früher erhobenen Befunden zu suchen, der bei Immunitätsversuchen mit Pertussis die auffallende Beobachtung machte, daß wesentliche Unterschiede bestanden zwischen Kulturen, die auf hämoglobinfreiem Nährboden gezüchtet wurden, und solchen Kulturen, die auf hämoglobinhaltigen Nährsubstraten wuchsen.

Die Schwankungen in der Aktivität der Meerschweinchenleukozyten, die ich auch aus Peritonealexsudat nach 24 Stunden vorher erfolgter Injektion von 10 ccm Aleuronatbouillon gewann, gaben kaum zu Störungen der Reaktion Anlaß, zumal wir bei diesen Bakteriotropinbestimmungen

auch keine absoluten, sondern nur Vergleichswerte erhalten können und nach Neufelds eigenem Wunsch auch nur erhalten wollen, wenn auch ein gewisser Mindestgehalt an diesen Immunstoffen zu fordern ist.

Die benutzten Sera wurden ebenso wie bei den Komplementbindungsversuchen nach dem Vorschlage von Krumbein und Schatiloff nicht durch Erwärmen inaktiviert, sondern erst stets nach mindestens 8 Tage langem Abstehen, wenn auf diese Weise jede Spur von Komplement verschwunden war, zu den Prüfungen herangezogen, und zwar in abgestuften Mengen von 0·01 bis 0·0001. Nach dem Vorschlage von Neufeld füllte ich in 5 cm lange Reagensgläschen von etwa 12 mm lichter Weite je 0·1 bzw. 0·03 ccm der betreffenden Serumverdünnung, bzw. in die Kontrollröhrchen je 1 Tropfen physiologische Kochsalzlösung oder Normalserum, dazu je 1 Tropfen Kokkenemulsion (in Bouillon und NaCl-Lösung āā) und schließlich je 2 Tropfen ziemlich konzentrierte Leukozytenaufschwemmung. Nach $1^1/_2$stündiger Bebrütung bei 37° wurden möglichst rasch Deckglaspräparate vom Bodensatz der einzelnen Röhrchen angefertigt, in Alkoholäther āā fixiert und mit alter Mansonscher Lösung gefärbt. Von einer Zählung der einzelnen gefressenen Kokken nach der zuerst von Leishman angegebenen Weise wurde abgesehen, da die Gegensätze zwischen den einzelnen Serumverdünnungen verhältnismäßig sinnfällige sind, und wir, wie an anderer Stelle bereits betont wurde, nur Vergleichs- und keine absoluten Werte erhalten.

Protokoll VIII veranschaulicht die Bestimmung des Bakteriotropingehaltes derselben Serumproben, deren komplementbindende Kraft bereits in den vorhergehenden Versuchen einer Prüfung unterzogen wurde. Wenn auch ein deutlicher Nachweis der Bakteriotropine noch bis zu den Verdünnungen 1 : 1000 gelingt, während sich ein Nachweis der Bordetschen Antikörper höchstens bis zur Verdünnung 1 : 200 einwandsfrei ermöglichen läßt, so fällt doch beim Vergleich der Protokolle VIII und IV eine offenbare quantitative Übereinstimmung der betreffenden Immunstoffe auf, die auch schon Onaka bei einzelnen Vergleichsversuchen gefunden hat. Wie dort, so halten sich auch hier das Berliner und Berner Serum auf ungefähr der gleichen Stufe, dann dürften das Wiener, Pariser und New Yorker Serum einen annähernd gleichen, das Darmstädter Serum einen etwas darunter liegenden Titer besitzen, und schließlich haben sich im Höchster Serum in der Konzentration von 1 : 100 nur sehr geringe phagozytosebefördernde Stoffe nachweisen lassen. Ebenso muß auch hier, wie oben beim Nachweis der komplementbindenden Antikörper betont werden, daß das richtige Ablesen der Resultate keine Schwierigkeiten bot, da recht wesentliche Differenzen in den einzelnen Stadien der Phagozytose konstatiert werden konnten.

Protokoll VIII.

Bakteriotropinversuch mit Stamm 3 am 10. VII. 1912.

Verdünnung	Serum Berlin	Serum Bern	Serum Wien	Serum New York	Serum Paris	Serum Darmstadt	Serum Höchst	Normalserum
0·01	$+_4$	$+_4$	$+_4$	$+_3$	$+_4$	$+_3$	$+_2$	—
0·003	$+_4$	$+_4$	$+_3$	$+_3$	$+_3$	$+_2$	—	—
0·001	$+_4$	$+_4$	$+_2$	$+_2$	$+_2$	$+_1$	—	—
0·0003	$+_1$	$+_1$	—	—	—	—	—	—
0·0001	—	—	—	—	—	—	—	—

NaCl-Kontrolle 1: — NaCl-Kontrolle 2: $+_1$.

$+_4$ = sehr stark, $+_3$ = ziemlich stark, $+_2$ = deutlich, $+_1$ = gering.

Dieser Versuch wurde mit Stamm 3, der auf schwach alkalischem Agar gut gewachsen war, genau nach der Originalvorschrift ausgeführt, mißlang aber, wie bereits oben erwähnt wurde, vollständig, wenn dazu eine 24stündige Bouillonkultur desselben Stammes 3 verwendet wurde.

Jedoch ließen die Bilder noch an Klarheit zu wünschen übrig. Die Leukozyten zeigten schon an einzelnen Stellen beginnende Degenerationserscheinungen, die auch bei abgekürzter Reaktionszeit auf 1 Stunde nicht ganz behoben wurden. Daher ging ich nach dem Vorschlage von Jobling dazu über, den ganzen Versuch in zwei Phasen sich abspielen zu lassen, und zwar zunächst die Kokken 1 Stunde im Brutschrank bei 37° mit dem Serum zu sensibilisieren und dann erst die kurz vorher auf 37° erwärmten Leukozyten zuzusetzen und nur $^1/_2$ Stunde fressen zu lassen. Die idealste Versuchsanordnung bestände allerdings noch in einer Einrichtung, die analog den Verhältnissen des Körperkreislaufs die Röhrchen mit den Leukozyten auf einer langsam rotierenden Scheibe im Brutschrank in ständiger Drehung erhielte. Doch läßt sich diesem Mangel an Bewegung, wenn auch nur unvollkommen, durch $^1/_4$stündiges Schütteln sämtlicher Röhrchen abhelfen.

Protokoll IX.

Bakteriotropinversuch mit Stamm 3 am 8. I. 1913.

Verdünnung	Serum Berlin	Serum Bern	Serum Wien	Serum New York	Serum Paris	Serum Darmstadt	Serum Höchst	Normalserum
0·01	$+_4$	$+_4$	$+_4$	$+_4$	$+_4$	$+_3$	$+_1$	—
0·003	$+_4$	$+_4$	$+_4$	$+_3$	$+_3$	$+_2$	—	—
0·001	$+_3$	$+_3$	$+_2$	$+_2$	$+_2$	$+_1$	—	—
0·0003	$+_1$	$+_1$	—	—	—	—	—	—
0·0001	—	—	—	—	—	—	—	—

NaCl-Kontrolle 1: —. NaCl-Kontrolle 2: —.

Protokoll X.
Bakteriotropinversuch mit Stamm 5.

Verdünnung	Serum Berlin	Serum Bern	Serum Wien	Serum New York	Serum Paris	Serum Darmstadt	Serum Höchst	Normalserum
0·01	$+_4$	$+_4$	$+_3$	$+_3$	$+_3$	$+_3$	$+_1$	—
0·003	$+_3$	$+_3$	$+_2$	$+_2$	$+_3$	$+_2$	—	—
0·001	$+_2$	$+_2$	$+_1$	$+_1$	$+_1$	—	—	—
0·0003	—	—	—	—	—	—	—	—
0·0001	—	—	—	—	—	—	—	—

NaCl-Kontrolle 1: —. NaCl-Kontrolle 2: —.

Nach dieser Methode wurde der Versuch VIII vom 10. Juli 1912 am 8. Januar 1913 mit Stamm 3 wiederholt, und die so gewonnenen Resultate sind in jeder Hinsicht eindeutig, wobei ganz besonders die zweite Kochsalzkontrolle bemerkenswert ist, die auch nach Beendigung des Versuchs kaum irgendwie nennenswerte Phagozytose erkennen läßt. (Protokoll IX.) Die mit einem anderen guten Stamm 5 erhaltenen Werte (Protokoll X) fielen zwar etwas niedriger aus, jedoch gaben die miteinander verglichenen Serumproben ebenfalls entsprechend niedrigere Ausschläge. Gleichzeitig konnte auch bei den Bakteriotropinen genau wie bei den Bordetschen Antikörpern eine wesentliche Abschwächung nach Verlauf eines $^1/_2$ Jahres und darüber nicht konstatiert werden.

IV. Zusammenfassung.

Die Prüfung der verschiedenen Wertbestimmungsmethoden des Meningokokkenserums führte zu folgendem Ergebnis:

1. Das Problem der Antitoxinprüfung im Tierversuch ist wegen der schwankenden Virulenz der Kokken und der variablen Empfindlichkeit der Versuchstiere noch in keiner befriedigenden Weise gelöst worden.

2. Ebensowenig brauchbar ist die Feststellung des Titers der Agglutinine, die auch zur Heilwirkung in gar keiner Beziehung stehen.

3. Dagegen gibt die Messung des Gehaltes an komplementbindenden Ambozeptoren vollkommen quantitativ und konstant verlaufende Ergebnisse. Mit dieser Methode werden in jeder Beziehung eindeutige Resultate erhalten, da bei richtiger Einstellung der verschiedenen Reagenzien infolge des auffallenden Gegensatzes zwischen Hemmung und Lösung Trugschlüsse infolge falscher subjektiver Auffassung des Untersuchers völlig ausgeschaltet werden.

4. Zu ebenso einwandsfreien Ergebnissen führt ferner die Bestimmung der Bakteriotropine, auf deren Vorhandensein offenbar auch zum nicht geringen Teil die Heilkraft der Sera zurückgeführt werden muß. Die klaren Unterschiede in den einzelnen Phasen der Phagozytose ermöglichen auch hier dem geübten Untersucher eine von falscher subjektiver Deutung unberührte Ablesung der einzelnen Resultate.

5. Auf Grund dieser Ergebnisse ist für eine event. staatliche Prüfung des Genickstarreserums die Messung des Gehaltes an komplementbindenden Ambozeptoren und an phagozytosebefördernden Stoffen zu empfehlen. Beide Methoden haben nach unseren Versuchen in sich völlig übereinstimmende Ergebnisse gezeigt, so daß sie sich gegenseitig ergänzen und kontrollieren.

Es ist mir eine angenehme Pflicht, an dieser Stelle für die Anregung und Durchsicht dieser Arbeit meinem verehrten Lehrer Hrn. Geheimrat Prof. Dr. A. v. Wassermann und für die freundliche Beaufsichtigung der Experimente Hrn. Regierungsrat Prof. Dr. Neufeld meinen ergebensten Dank auszusprechen.

Literatur-Verzeichnis.

1. Bonnhoff, *Münchener med. Wochenschrift.* 1901. S. 91.
2. Bordet-Gengou, *Annales de l'Institut Pasteur.* 1901. T. XV. p. 289.
3. Currie-MacGregor, *The Lancet.* 1908.
4. Dopter, *Extrait des Bull. et Mémoires de la Soc. Méd. des Hôpit. de Paris*, 11. XII. 1908.
5. Derselbe, *Bull. de l'Inst. Pasteur.* 1909. Nr. 22 u. 23.
6. Derselbe, *Progrès Méd.*, 25. I. 1910.
7. Derselbe, *Annales de l'Institut Pasteur.* T. XXIV. April 1910.
8. Flexner, *Journ. amer. med. assoc.* 1906. Vol. XLVII. p. 560.
9. Derselbe, *Centralblatt f. Bakteriologie.* 1907. Orig. Bd. XLIII. S. 99.
10. Derselbe, *Journ. of experim. Med.* 1907. Vol. IX. p. 105.
11. Derselbe, *Ebenda.* 1907. Vol. IX. p. 168.
12. Flexner u. Jobling, *Ebenda.* 1908. Vol. X. p. 141.
13. Dieselben, *Ebenda.* 1908. Vol. X. p. 690.

14. Dieselben, *Centralbl. f. inn. Med.* 1908. Nr. 36.

15. Dieselben, *Journ. amer. med. assoc.* — Ref. in *Deutsche med. Wochenschrift.* 1909. Nr. 47. S. 2136.

16. Hochhaus, *Med. Klinik.* 1908. Nr. 20. S. 737.

17. Jäger, *Zeitschrift f. Hygiene u. Infektionskrankheiten.* 1903. Bd. XLIV.

18. Jobling, *Journ. of experim. Med.* 1909. Vol. XI.

19. Jochmann, *Deutsche med. Wochenschrift.* 1906. S. 788.

20. Derselbe, *Ebenda.* 1911. S. 1733.

21. Kolle, *Bericht über den XIV. internationalen Kongreß für Hygiene und Demographie 1907.*

22. Kolle u. Wassermann, *Deutsche med. Wochenschrift.* 1906. S. 609.

23. Dieselben, *Klin. Jahrbuch.* 1906. Bd. XV. S. 520.

24. Kraus u. Bächer, *Zeitschrift f. Immunitätslehre.* 1909. Bd. III. Hft. 1.

25. Kraus u. Dörr, *Wiener klin. Wochenschrift.* 1908. Nr. 1.

26. Krumbein u. Diehl, *Arb. a. d. Berner Institut f. Infektionskrankheiten.* 1908. Hft. 2.

27. Krumbein u. Schatiloff, *Deutsche med. Wochenschrift.* 1908. Nr. 23

28. Levy, *Ebenda.* 1908. Nr. 4. S. 139.

29. Derselbe, *Klin. Jahrbuch.* 1908. Bd. XVIII. S. 317.

30. Derselbe, *Münchener med. Wochenschrift.* 1908. Nr. 8. S. 419.

31. Derselbe, *Klin. Jahrbuch.* 1911. Bd. XXV. S. 121.

32. v. Lingelsheim u. Leuchs, *Ebenda.* 1906. Bd. XV. S. 27 u. 411.

33. Matthes, *Med. Klinik.* 1908. Nr. 20. S. 733.

34. Netter, *Bull. et Mémoires de la Soc. Méd. des Hôpit. de Paris,* 11. XII. 1908

35. Derselbe, *Bull. de l'Acad. de Méd.* 9. III. 1909.

36. Derselbe, *Ebenda.* 27. VII. 1909.

37. Derselbe, *Assoc. Franç. de Pédiatrie, Congrès de 1910.*

38. Derselbe, *Soc. Méd. des Hôpit. de Paris,* 22. VII. 1910.

39. Neufeld, *Med. Klinik.* 1908. Nr. 30. S. 1158.

40. Derselbe, *Arbeiten aus dem Kaiserl. Gesundheitsamte.* 1910. Bd. XXXIV. Hft. 3. S. 266.

41. Onaka, *Zeitschrift f. Hygiene u. Infektionskrankheiten.* 1910. Bd. LXVI. Hft. 3. S. 348.

42. Ruppel, *Deutsche med. Wochenschrift.* 1906. Nr. 34.

43. A. Wassermann, *Ebenda.* 1907. Nr. 39. S. 1586.

44. A. Wassermann u. Bruck, *Med. Klinik.* 1905. Nr. 55.

45. A. Wassermann u. Leuchs, *Klin. Jahrbuch.* 1908. Bd. XIX. S. 426.

46. A. Wassermann u. Ostertag, *Zeitschrift f. Hygiene u. Infektionskrankheiten.* 1904. Bd. XLVII. S. 416.

47. Watt, Ref. *Münchener med. Wochenschrift.* 1908. Nr. 46.

48. v. Wyss, *Korrespondenzbl. f. Schweizer Ärzte.* 1909. Nr. 18

Lebenslauf.

Ich, Georg Richard Blumenthal, wurde am 8. April 1888 zu Biesenthal, Kr. Ober-Barnim, als der Sohn des prakt. Arztes, jetzigen Kgl. Sanitätsrates Dr. Ludwig Blumenthal und seiner Ehefrau Rosa, geb. Meyers, geboren und bin evangelischer Konfession.

Nach bestandenem Abiturientenexamen am Friedrichs-Gymnasium zu Berlin widmete ich mich von Oktober 1905 ab dem Studium der Medizin in Berlin und Erlangen, bestand im März 1908 die ärztliche Vorprüfung in Berlin und studierte in Halle a/S. weiter, wo ich am 31. Januar 1911 das ärztliche Staatsexamen ablegte. Am 1. Februar 1912 erhielt ich meine Approbation als Arzt und war seitdem Volontär-Assistent, seit dem 1. Januar 1913 bin ich etatsmäßiger Assistent am Kgl. Institut für Infektionskrankheiten „Robert Koch“ zu Berlin.